

# 肺腺癌 EGFR-TKI 获得性耐药突变 T790M的发现

评价者: 王 洁<sup>1</sup>

文献合成者: 白晓燕<sup>2</sup>

(1. 北京大学临床肿瘤学院, 北京 100036;

2. 广东省人民医院肿瘤中心、广东省肺癌研究所, 广州 510080)



王 洁, 女, 内科学博士, 肿瘤学博士后。北京大学临床肿瘤学院 & 北京肿瘤医院主任医师、副教授、胸部肿瘤内科主任, 大内科副主任, 研究生导师。中国抗癌协会肺癌专业委员会委员, CSCO 执行委员, 北京医学会肿瘤专业委员会委员, 中华医学会北京分会对外联络部专家组成员, 中华结核与呼吸杂志编委。

十多年来一直致力于肺癌规范化、个体化多学科综合治疗及相关研究。2002 年 12 月至 2004 年 12 月受美国 NCI "Oncology Research Faculty Development Program" 资助, 作为访问教授在 MD Anderson Cancer Center 胸部/头、颈肿瘤内科进修肺癌为主的实体瘤临床诊治及相关研究, 丰富了肺癌个体化多学科综合治疗的临床经验, 对肺癌的个体化靶向治疗、化疗预防及肺癌发生发展过程中甲基化失衡有较深入的研究。2004 年 12 月回国后组织和推动了北京肿瘤医院肺癌多学科查房与协作。在应用基础研究方面围绕多药耐药, 从组织及外周血探寻能预测化疗和分子

靶向治疗疗效、预后的分子标志, 部分研究成果已应用于临床实践。

作为课题负责人多次承担国家自然科学基金(2005 年、2007 年)、北京市自然科学基金(1999 年)、北京市首发基金(2005 年、2007 年)、国家 863 科技支撑项目(分课题负责人)等研究。1999 年入选北京市“科技新星”计划。在国内外肿瘤核心期刊如《Cancer Research》、《Clinical Cancer Research》发表论文 40 余篇, 参编专著 3 部。

[关键词] 肺肿瘤; 耐药; 突变; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-5144(2008)04-0201-04

Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Tyrosine Kinase Inhibitors Is Associated with T790M Mutation in the EGFR Kinase Domain//Reviewer: WANG Jie<sup>1</sup>, Literature Co-worker: BAI Xiao-yan<sup>2</sup>

Key words: lung neoplasms; resistance; mutation; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor

Reviewer's address: Peking University School of Oncology, Beijing 100036, China

## 1 文献来源

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to Gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792.

Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. PLoS Med, 2005, 2(3): e73.

## 2 证据水平

2b。

## 3 背景

• 对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 抑制剂吉非替尼或埃罗替尼治疗有效的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者, 通常有编码 EGFR 激酶域外显子的突变。

• 尽管这些病人在应用吉非替尼或埃罗替尼治疗起始阶段疗效很好, 但最终大多数患者仍因耐药而复发。

• 对吉非替尼或埃罗替尼产生耐药的确切机制尚不明确。

## 4 目的

探讨用 EGFR 抑制剂吉非替尼或埃罗替尼治疗的 NSCLC 患者最终对其产生耐药的可能机制。

## 5 研究设计

• 研究条件: 美国哈佛大学医学院(Harvard Medical School) 和克利夫兰 Case 大学医学院爱尔兰癌症中心, 美国纽约 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心。

• 研究方法: 应用基础研究。

• 研究对象: 诊断明确的 NSCLC 病人, 给予吉非替尼或埃罗替尼治疗, 治疗开始阶段病情有明显改善, 但在继续用药过程中病情复发。

• 干预措施:

对所有符合条件的标本进行 EGFR (外显子 18-24) 和 KRAS<sup>2</sup>(外显子 2) 的扩增测序。所有测序反应都从正反两个方向进行, 所有突变都至少经两

次确认。用毛细管电泳仪对荧光标记 PCR 产物长度进行分析, 以检测特异性外显子 20 突变(T790M)。制备跨越外显子 20 的 EGFR cDNA 片段, 并行 PCR 扩增。将 PCR 产物连接入质粒载体并测序。构建 delL747-E749、A750P、L858R 及 T790M 突变 EGFR。所有突变克隆全部重新双向测序, 以确保没有其他突变被导入。各种 EGFR 在 239T 人胚肾细胞中瞬时表达。用不同浓度吉非替尼或埃罗替尼对细胞进行处理, 并做 Western Blotting。检测吉非替尼对上述几种类型 EGFR 的抑制作用, 确认 T790M 继发突变可导致获得性耐药。对 EGFR 激酶域行晶体结构分析, 深入探讨 T790M 导致获得性耐药机制。

同时将 8 个 NSCLC 细胞系: H1650、H1975、H2030、H2347、H2444、H358、H1734、H3255 在有吉非替尼或埃罗替尼持续存在的环境中孵育 48 h, 然后行活力测定, 检测在细胞系中是否也存在同样的 T790M 继发突变, 确认 T790M 突变细胞系对吉非替尼或埃罗替尼耐药。每个细胞系都做了三次独立试验。试验中每一条条件都经 4~8 次重复。

为排除 T790M 为以前忽略的 EGFR 突变, 回顾性分析 96 例新鲜冰冻及 59 例石蜡包埋 NSCLC 肿瘤组织标本的 EGFR 外显子 20 序列。这些标本都来自 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂治疗前。

• 评价指标: 比较使用吉非替尼或埃罗替尼前后标本的突变差异; 治疗后耐药标本是否有 T790M 突变; 建立的 NSCLC 细胞系是否有 T790M 突变。

## 6 主要结果

• 入组病人吉非替尼或埃罗替尼治疗前后标本的 EGFR 及 KRAS 突变分析见表 1。另有 3/7 对吉非替尼或埃罗替尼耐药患者没有检测到除外显子 19 缺失之外的其它突变。PCR-RFLTP 分析得出

表 1 样本的 EGFR 及 KRAS 突变分析

病人	药物	标本	获得时间	肿瘤细胞比例	EGFR 突变	KRAS 突变
1	吉非替尼	原发病变活检	治疗前	N/A	delL747-S752	N/A
		复发后活检	治疗 24 个月	30%	delL747-S752+T790M	N/A
2	吉非替尼	原发病变活检	治疗前	少量	无	无
		进展肺活检	治疗 9 个月	>85%	L858R+T790M	无
		胸水	治疗 12 个月	>85%	L858R+T790M	无
3	埃罗替尼	原发病变	治疗前	>85%	delL747-E749, A750P	无
		进展胸椎活检	治疗 23 个月	>85%	delL747-E749, A750P+T790M	无
		进展肺活检	治疗 25 个月	>85%	delL747-E749, A750P+T790M	无
4	吉非替尼	用吉非替尼前病变组织	治疗前	>85%	delE746-A750	无
		胸水	治疗 4 个月停药 4 个月后	>50%	delE746-A750+T790M	无

相同结果。

- 8 个 NSCLC 细胞系 EGFR 及 KRAS 突变分析见表 2。H1975 对吉非替尼或埃罗替尼的敏感性比 H2355 小 100 倍。

- 155 例未经吉非替尼或埃罗替尼治疗标本均无 T790M 突变。

表 2 NSCLC 细胞系 EGFR 及 KRAS 突变分析

细胞系	EGFR 突变	KRAS 突变	吉非替尼 IC <sub>50</sub>
H1975	L858R+T790M	无	1 μmol
H3255	L858R	无	0.01 μmol
H1650	DelE746-A750	无	N/A
H2030	无	G12C	1 μmol
H2347	无	L19F	N/A
H1734	无	G13C	N/A
H2444	无	G12V	N/A
H358	无	G12C	N/A

注: N/A 表示无可用数据。

## 7 结 论

非小细胞肺癌患者对吉非替尼或埃罗替尼获得性耐药与 EGFR 外显子 20 T790M 继发突变有关。

## 8 评 论

众所周知,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)吉非替尼、埃罗替尼在改善晚期非小细胞肺癌远近期疗效与生活质量中的作用已端倪初露,显示令人鼓舞的前景,并逐渐成为非小细胞肺癌治疗不可或缺的重要方法之一。然而我们目前对其所知仅为冰山一角,有很多困惑与难题纷至沓来,有待进一步研究,而其中最令人关注的焦点之一是 TKI 的继发耐药问题。

2004 年 Paez 及 Lynch 等的报道显示 EGFR 突变与吉非替尼疗效相关,从而揭示了 EGFR-TKI 治疗晚期 NSCLC 的分子机制<sup>[1,2]</sup>。EGFR 突变分布与临床上 EGFR-TKI 治疗的优势人群相一致,主要见于女性、腺癌、非吸烟者及亚裔患者<sup>[3,4]</sup>。大量临床研究证实,EGFR 突变阳性者对 EGFR-TKI 的有效率为 50%~80%,而野生型患者的有效率仅约 10%~15%<sup>[5]</sup>。筛选可能受益人群将极大地提高晚期非小细胞肺癌的疗效。

然而,分子靶向治疗疗效维持时间短,中位疾病进展时间为 8 个月左右,几乎所有 EGFR-TKI 治疗有效的患者,最终难逃复发进展的厄运。为什么

初始对 TKI 有效的病人,在治疗过程中会因获得性耐药而导致治疗失败?什么样的机制在获得性耐药中起着主导作用? 2005 年 2 月 Kobayashi 等发表于《N Engl J Med》上的文章率先解答了这一问题<sup>[6]</sup>。该研究对 1 例治疗前组织中有 del L747-S752 位点缺失突变、接受吉非替尼二线治疗达完全缓解 28 个月后疾病进展的 71 岁患者进行了二次活检,分析其活检组织基因突变状况,发现在原有突变基础上 EGFR 确实发生了新的基因突变,即在 20 外显子 790 位上密码子发生了错义突变(T790M),从而使 EGFR 重新处于被激活状态。研究者因此认为获得性耐药源自 T790M 突变引起酪氨酸激酶域空间构象改变,影响其与吉非替尼、埃罗替尼的结合,此外继发突变亦极大地减弱了 EGFR-TKI 与激酶域之间氢键的亲和力。为进一步证实 T790M 突变导致病人对吉非替尼耐药,研究者又进行了体外试验。将构建的 T790M 突变片段转染至 COS-7 细胞内,用不同浓度的吉非替尼(从 0~2.0 μM)处理转染细胞,随后采用 Western 杂交方法检测其磷酸化 EGFR 的表达情况,结果显示发生 T790M 突变的细胞对吉非替尼耐药。有趣的是该研究还发现一种新的 EGFR 抑制剂 CL-387785,无论是对单纯的 del L747-S752 突变,还是对同时携带 del L747-S752 及 T790M 突变的细胞均有效。这篇论文虽仅分析了 1 例患者标本,但阐明了肺癌对 EGFR-TKI 获得性耐药的生物学原理,更为重要的是为克服获得性耐药奠定了理论基础。因此发表于《N Engl J Med》是众望所归。

无独有偶,2005 年 3 月另一组发表于《PLoS Medicine》、有关 EGFR 突变与耐药的报道接踵而至<sup>[7]</sup>。Pao 等通过检测 6 例疾病进展后原发与转移活检标本 EGFR 突变及 KRAS 突变,发现其中 3 例存在 T790M 错义突变,初治前及疾病进展后的标本均无 KRAS 突变。同时采用 PCR-RFLP 验证了上述结果,为进一步证实 T790M 并非原发突变,作者回顾性研究了 155 例 NSCLC 患者治疗前肿瘤组织 EGFR,结果无 1 例携带 T790M 突变。Pao 同样对携带 L858R+T790M 两种突变和 L858R 单一突变的细胞株的抗药性进行比较,结果显示前者的抗药性是后者的 100 倍(IC<sub>50</sub> 1 μmol vs. 0.01 μmol)。

以上两篇论文无疑是最早探讨肺癌 EGFR 二次突变与获得性耐药的佳作。或许亦是近年文章发表史上以少胜多,以“奇”制胜的典范之一。从中我们悟出一篇文章质量的高低并非绝对取决于病例

数量的多少,而在于其研究是否严谨、设计是否合理,若能敏锐地捕捉到临床上重大的有争议问题的关键所在,且设计上环环相扣、技术路线清晰明了,结果将具有较高的可信度,甚至获得突破性的进展。

不可否认这些研究亦存在些许缺陷。如 Pao 的文章中有 3 例疾病进展的患者未检测到 T790M 突变,虽然文章中亦提及 T790M 突变并非获得性耐药的唯一原因,但未进一步分析可能存在的其它机制。目前已知除 T790M 突变外,尚有多种机制影响获得性耐药。如 EGFR 旁路 TK 信号通路异常(c-Met 扩增),EGFR 下游信号分子变异导致 PTEN 失活等均与获得性耐药相关。进一步分析有可能揭示更深层的耐药机制。

此外,虽然以上 2 篇文章均发现 T790M 突变仅与获得性耐药相关,但 T790M 是否只存在于疾病进展的组织中,尚需进一步研究。近日《N Engl J Med》再次发表有关 T790M 突变的文章<sup>[8]</sup>,分析了 27 例晚期非小细胞肺癌外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)及肿瘤组织的 EGFR 突变状况,发现 T790M 不仅存在于已经接受 EGFR-TKI 治疗患者的 CTC 中,亦存在于治疗前肿瘤组织中,且与较差的无进展生存时间有关。北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院胸部肿瘤内科对 256 例治疗前非小细胞肺癌组织 EGFR 19-21 外显子突变检测中,亦发现 2 例存在 T790M 突变。对此需前瞻性、大样本、多中心研究。

## [参 考 文 献]

- [1] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to Gefitinib therapy [J]. Science, 2004, 304: 1497- 1500.
- [2] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib [J]. N Engl J Med, 2004, 350: 2129- 2139.
- [3] Huang SF, Liu HP, Li LH, et al. High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to Gefitinib responsiveness in Taiwan [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 8195- 8203.
- [4] Qin BM, Chen X, Zhu JD, et al. Identification of EGFR kinase domain mutations among lung cancer patients in China: Implication for targeted cancer therapy [J]. Cell Res, 2005, 15: 212- 217.
- [5] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and Gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 643- 655.
- [6] Kobayashi S, Boggon T, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small cell lung cancer Gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352: 786- 792.
- [7] Pao W, Miller V, Politi K, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain [J]. PLoS Med, 2005, 2(3): e73.
- [8] Maheswaran S, Sequist L, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells [J]. N Engl J Med, 2008, 359(8): 1- 12.

[收稿日期] 2008- 07- 14

## 本期循证评价原始文献来源期刊

本期循证评价的原始文献来自以下期刊:

New England Journal of Medicine

Public Library of Science( PLoS) Medicine

Science

Proceedings of the National Academy of Sciences ( PNAS)

Cancer Research

Cancer Cell

Nature Genetics

Journal of Clinical Oncology

Clinical Cancer Research

《循证医学》杂志感谢各生物医学期刊带来的高质量的证据。